

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年1月18日 (18.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/03740 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 45/00, (72) 発明者; および  
38/36, A61P 7/02, 7/04, 1/00, 43/00 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 嶋 緑倫  
(SHIMA, Midori) [JP/JP]; 〒634-0813 奈良県橿原市  
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04595 四條町840 奈良県立医科大学内 Nara (JP). 小出武比  
古 (KOIDE, Takehiko) [JP/JP]; 〒678-1297 兵庫県赤  
(22) 国際出願日: 2000年7月10日 (10.07.2000) 穂郡上郡町光都3-2-1 姫路工業大学内 Hyogo (JP). 細  
川和也 (HOSOKAWA, Kazuya) [JP/JP]; 〒211-0002 神  
(25) 国際出願の言語: 日本語 奈川県川崎市中原区上丸子山王町1547-1 Kanagawa  
(JP). 鈴木豊明 (SUZUKI, Toyoaki) [JP/JP]; 〒132-0023  
(26) 国際公開の言語: 日本語 東京都江戸川区西一之江4-2-24 Tokyo (JP). 永田政令  
(NAGATA, Masanori) [JP/JP]; 〒140-0015 東京都品川  
(30) 優先権データ: 区西大井3-16-40 Tokyo (JP).  
特願平11/194622 1999年7月8日 (08.07.1999) JP  
特願2000/25341 2000年2月2日 (02.02.2000) JP  
特願2000/34169 2000年2月10日 (10.02.2000) JP  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 藤森工  
業株式会社 (FUJIMORI KOGYO CO., LTD.) [JP/JP];  
〒103-0002 東京都中央区日本橋馬喰町1丁目4番16号  
Tokyo (JP).  
(74) 代理人: 八田幹雄, 外 (HATTA, Mikio et al.); 〒102-  
0084 東京都千代田区二番町11番地9 ダイアパレス二  
番町 Tokyo (JP).  
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,

[続葉有]

(54) Title: SERINE PROTEASE INHIBITOR

(54) 発明の名称: セリンプロテアーゼ抑制剤

(57) Abstract: A serine protease inhibitor capable of selectively inhibiting the target serine protease activity alone. This serine protease inhibitor binds to the substrate of serine protease competitively with the serine protease to thereby inhibit the reaction between the serine protease and the substrate. This inhibitor specifically binds to the substrate of the target serine protease to thereby inhibit the activity of the serine protease. This serine protease inhibitor is useful as an antithrombotic agent, a fibrinolysin inhibitor, an anti-digestive enzyme agent and a remedy for disseminated intravascular coagulation.

(57) 要約:

目的とするセリンプロテアーゼの酵素活性のみを選択的に阻害することが可能な、セリンプロテアーゼ抑制剤を提供する。セリンプロテアーゼの基質に、該セリンプロテアーゼと競合して結合することによって、該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質を含有するセリンプロテアーゼ抑制剤である。該抑制剤は、抑制の対象となるセリンプロテアーゼの基質に対し特異的に結合してセリンプロテアーゼの活性を抑制する。該セリンプロテアーゼ抑制剤は、抗血栓剤、線溶酵素抑制剤、抗消化酵素剤、播種性血管内凝固の治療剤として有用である。

WO 01/03740 A1



IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,  
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,  
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

セリンプロテアーゼ抑制剤

## 5 技術分野

本発明は、セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質を含有するセリンプロテアーゼ抑制剤に関する。

## 10 背景技術

酵素は、生体細胞が生産するタンパク質性の高分子有機触媒である。この中で、セリンプロテアーゼは、セリン残基の水酸基を活性中心とするプロテアーゼであり、動物の消化酵素であるペプシン、トリプシン、キモトリプシン；受精に際して卵の透明層を溶解するアクロシン；血液  
15 の凝固や線溶に関与するトロンビン、プラスミン、活性化血液凝固第 I 因子、活性化血液凝固第 VII 因子、活性化血液凝固第 IX 因子、活性化血液凝固 X 因子、活性化血液凝固 XI 因子および活性化血液凝固第 XI I 因子；炎症に関係の深いエラスターゼ等が含まれる。

ここに、トロンビンをはじめとする活性化血液凝固因子は深く血液凝  
20 固に関連し、その活性の異常亢進は、播種性血管内凝固（DIC）をはじめとする血液凝固異常に直結する。又トロンビンは血小板上にある受容体に作用し血小板の凝集を促進させる働きも持つ。また、プラスミン、uPA（ウロキナーゼ）、tPA（組織プラスミノゲン活性化因子）は線溶に関連しフィブリンを分解する機能を持つがその活性亢進状態は  
25 出血性素因の原因となる。さらにプラスミン、uPAは血管新生、癌細胞の増殖、ガン細胞の転移に深く関連していることも知られ、その活性

抑制は抗癌作用を持つことが知られている。

このように様々な疾患に対しセリンプロテアーゼは深く関与し、その治療においてセリンプロテアーゼ活性の阻害、抑制は非常に重要である。

このセリンプロテアーゼの触媒中心は、いずれも活性セリン残基とその近傍に存在するヒスチジン残基のイミダゾール環とアスパラギン酸残基の $\beta$ -カルボキシル基電荷リレー系で構成されている。基質はプロテアーゼによって異なるが、プロテアーゼによる加水分解は、基質分子(CO-NH)のアシル成分(-CO)が、活性セリンの水酸基へ移転することによって進行する。一方、生物界には、これらプロテアーゼのある種のもの特異的に強く結合して酵素活性を可逆的に阻害するプロテアーゼ抑制剤も存在し、それぞれのプロテアーゼ作用を制御している。したがって、セリンプロテアーゼ抑制剤を使用すれば疾病のもとになる反応系を停止させることができ、医薬品として使用することが可能である。

例えば、経口用合成トリプシン剤であるメシル酸ナファモスタットは、膵管内のトリプシンの活性を阻止することにより、腹痛などの自覚症状の軽減と高アミラーゼ血症の改善に使用されている。

また、播種性血管内凝固症候群をはじめとする血栓症の治療および予防においては、抗血小板薬や抗凝固薬などの、数多くの血栓形成予防薬が用いられている。抗凝固薬としては、従来、活性化血液凝固第II因子、活性化血液凝固第VII因子、活性化血液凝固第IX因子、および活性化血液凝固第X因子などのセリンプロテアーゼの活性を阻害するメシル酸ガベキサートやメシル酸ナファモスタットなどのセリンプロテアーゼ抑制剤が使用されている。

しかしながら、従来のセリンプロテアーゼ抑制剤である上記メシル酸ガベキサートやメシル酸ナファモスタットは、該化合物がセリンプロテ

アーゼ活性部位に結合してセリンプロテアーゼ活性を抑制するものであり、キモトリプシンなどの消化酵素を抑制すると共にこれらがトロンビンや第Xa活性を中和するために、抗凝固剤としても使用されるものである。いわば、従来のセリンプロテアーゼ抑制剤は、セリンプロテアーゼの活性領域に結合することによってセリンプロテアーゼの活性を抑制するものであったが、セリンプロテアーゼの種類による高い選択性が得られないのである。従来のセリンプロテアーゼ抑制剤は、セリンプロテアーゼの活性領域の構造が比較的類似した構造を持つことから、目的とするセリンプロテアーゼの酵素活性のみを選択的に阻害することは困難であった。

#### 発明の開示

本発明者らは、前述の従来技術の問題点に鑑み鋭意研究を重ねた結果、該セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって、該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質を含有するセリンプロテアーゼ抑制剤であれば、目的とするセリンプロテアーゼの酵素活性のみを選択的に阻害することが可能であることを見だし、この知見に基づいて本発明を完成させた。

本発明は、下記の(1)～(5)の構成からなる。

- (1) セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質を含有するセリンプロテアーゼ抑制剤。
- (2) 前記セリンプロテアーゼ抑制剤を含有する、抗血栓剤。
- (3) 前記セリンプロテアーゼ抑制剤を含有する、uPA, tPA, プラスミンの線溶酵素抑制剤。
- (4) 前記セリンプロテアーゼ抑制剤を含有する、抗消化酵素剤。

(5) 前記セリンプロテアーゼ抑制剤を含有する、播種性血管内凝固の治療剤。

本発明によれば、セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質、例えば、該物質としてアンヒドロ化セリンプロテアーゼを使用すると、アンヒドロ化セリンプロテアーゼが起源となるセリンプロテアーゼの基質に対し特異的に結合するという全く新規の阻害形式により、特異的に活性を阻害する極めて生体適合性の高いセリンプロテアーゼ阻害剤である。

10

以下本発明を詳細に説明する。

本発明の第一は、セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質を含有するセリンプロテアーゼ抑制剤である。

15 本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤に含有される、「セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質（以下「Ser-P抑制物質」と記述する。）」とは、抑制の対象とするセリンプロテアーゼと競争してその基質と結合し、これによってセリンプロテアーゼと基質との結合を減少させ、結果的に該セリンプロテアーゼの活性を特異的に抑制するものである。

20 本発明では、該Ser-P抑制物質は、それ自体がセリンプロテアーゼ活性を示さない物質であり、かつ該物質はセリンプロテアーゼと類似した構造であることが好ましい。ここに類似した構造とは、少なくとも基質との結合部位の構造が類似して基質との結合能を保持する場合をいう。これによって目的とするセリンプロテアーゼの基質と結合でき、結

25

果としてセリンプロテアーゼと基質との結合を減少させることができるからである。

本発明において、S e r-P抑制物質は特に限定されるものではないが、たとえば、遺伝子操作によってセリンプロテアーゼの少なくとも一つのアミノ酸を置換、付加、欠如させることによって得られた物質がある。

遺伝子操作によってセリンプロテアーゼの少なくとも一つのアミノ酸を置換、付加、欠如させることによって得られたS e r-P抑制物質では、活性化血液凝固第II因子を例にとれば、①遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第II因子の活性セリンのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加することにより活性を失わせた物質である活性化血液凝固第II因子の変異体、②遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第II因子の活性セリン付近のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加することにより活性を失わせた物質である活性化血液凝固第II因子の変異体、③遺伝子組換え操作により活性化血液凝固第II因子の活性セリンのアミノ酸および該活性セリン付近のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が、それぞれ相互独立的に欠失、置換または付加することにより活性を失わせた物質である活性化血液凝固第II因子の変異体が挙げられる。また、他の活性化血液凝固第II因子の変異体についてもそれぞれ上記活性化血液凝固第II因子の変異体と同様に①～③に示す物質（変異体）が存在し得るものである。

また、S e r-P抑制物質としてはアンヒドロ化されたセリンプロテアーゼなどを挙げることができる。この理由は以下の通りである。

従来から、これらセリンプロテアーゼはその触媒活性が活性部位のセリン残基の水酸基にある事が知られている。しかしながら、我々は、セ

リン残基の水酸基は基質親和性において必ずしも必要ではなく、結合に対し立体障害を引き起こさない形で水酸基を取り除いたアンヒドロ誘導体は元の酵素の基質に対し触媒活性を失うものの、元のセリンプロテアーゼと同様の結合能を保持することを見出した。そして、該アンヒドロ

5 化セリンプロテアーゼは、起源となるセリンプロテアーゼと競争してその基質に結合するため、これによってセリンプロテアーゼと基質との結合を阻害し、セリンプロテアーゼ活性を抑制できるのである。なお、酵素は酵素自体の3次元構造または4次元構造に依存して基質と結合し、これゆえに基質特異性が発揮される。本発明では、特定のプロセスによ

10 るセリンプロテアーゼのアンヒドロ化処理を行うことによって、元のセリンプロテアーゼの基質特異性を保持すると共にプロテアーゼ活性のみを失わせることができるのである。これによって、起源になるセリンプロテアーゼの酵素活性の発現のみを選択的に抑制することができるのである。この点、従来の阻害剤が一般に低分子化合物であり、該阻害剤が

15 酵素と基質との結合部位内に存在する酵素活性領域に結合することで基質と酵素との結合や酵素活性の発現を阻害するものであったため、活性領域の構造が類似する酵素の全てに阻害効果を発現した。しかしながら本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤は、基質特異性のある結合能を保持するものであるために極めて選択性が高く、かつ生体適合性の高いセリ

20 ンプロテアーゼ阻害剤となるのである。従来のセリンプロテアーゼ阻害剤がセリンプロテアーゼ活性部位に結合して酵素活性を阻害する薬剤の開発を中心としたため、1種類のセリンプロテアーゼに対する特異的な阻害剤の開発は困難であったが、本発明はこれを克服したものである。したがって、本発明において、Ser-P抑制物質は、アンヒドロ化セ

25 リンプロテアーゼであることが好ましい。

本発明において、酵素活性抑制の対象となるセリンプロテアーゼは特



に限定されるものではないが、具体的には、活性化血液凝固第 II 因子、活性化血液凝固第 VII 因子、活性化血液凝固第 IX 因子、活性化血液凝固第 X 因子、活性化血液凝固第 XI 因子、活性化血液凝固第 XII 因子等の活性化血液凝固因子；uPA, tPA, プラスミン等の線溶酵素；カリクレイン；  
5    プロテイン C 等の抗凝固蛋白；トリプシン、キモトリプシン、アクロシン等の酵素を挙げることができる。しかしながらアンヒドロ化できこれによって結合能を保持したままセリンプロテアーゼ活性を失うものであればこれに限られるものではない。

本発明で使用する「アンヒドロ化セリンプロテアーゼ」とは、セリン  
10    プロテアーゼの活性中心である活性セリン残基をデヒドロアラニンと置換したものである。Ser-P 抑制物質がアンヒドロ化セリンプロテアーゼであれば、上記のごとく、実質的に各セリンプロテアーゼ活性を特異的に抑制する事が可能であり、新機構の血栓形成予防薬を含むセリン  
15    プロテアーゼ抑制剤として有用であるだけでなく、発酵工業や、有用蛋白精製などのそれぞれの分野におけるセリンプロテアーゼ活性の制御において、有効に使用することができる。

本発明において、セリンプロテアーゼのアンヒドロ化部位は、活性セリン残基のみであることが好ましい。これによって起源となるセリンプロテアーゼが有する基質特異的な結合能を保持できるからである。

20    アンヒドロ化セリンプロテアーゼは、特に限定されるものではないが、アンヒドロ化活性化血液凝固第 II 因子、アンヒドロ化活性化血液凝固第 VII 因子、アンヒドロ化活性化血液凝固第 IX 因子、またはアンヒドロ化活性化血液凝固第 X 因子から選ばれた 1 種以上であることが好ましい。

25    アンヒドロ化されるセリンプロテアーゼは、何れの方法で得られたものであっても構わない。具体的には、血漿より精製することにより得ら

れたセリンプロテアーゼであっても、遺伝子操作によって得られたセリンプロテアーゼであってもよい。

アンヒドロ化セリンプロテアーゼを製造する方法は、特に限定されるものではないが、

- 5       (1)   下記1～3の工程を順次行い、少なくとも回収操作を行う工程において、多価アルコールおよび糖類よりなる群より選ばれた1種以上の化合物と、塩若しくは両性電解質を共存させる方法であることが好ましい。この方法によれば、基質特異的な結合能を保持することができるからである。

- 10       1. セリンプロテアーゼの活性セリン残基部位と阻害剤とを反応させる工程（第1工程）

2. アルカリ処理を行う工程（第2工程）

3. 回収を行う工程（第3工程）

- 15       (2)   上記（1）に記載の製造方法において、アルカリ処理を行う工程がpH 11.0～13.5の範囲で行われることを特徴とするものである。

- 20       (3)   上記（1）または（2）に記載の製造方法において、前記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物が、グリセリン、エチレングリコールおよびショ糖よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物であることを特徴とするものである。

- 25       (4)   上記（1）～（3）のいずれか1つに記載の製造方法において、前記塩もしくは両性電解質が、塩化ナトリウム、塩化カリウムおよびグリシンよりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物であることを特徴とするものである。

- (5)   上記（1）～（4）のいずれか1つに記載の製造方法におい

て、前記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物は、気温23℃、相対湿度50%の環境下において、液体である場合は体積比で、粉体、粒体または固体である場合は質量比で、全体に対する割合が5%以上であることを特徴とするものである。

- 5 (6) 上記(1)～(5)のいずれか1つに記載の製造方法において、前記塩もしくは両性電解質の濃度が、0.2M以上であることを特徴とするものである。

上記製造方法につき、以下により詳細に説明する。

上記アンヒドロ化セリンプロテアーゼの製造方法は、

- 10 1. セリンプロテアーゼの活性セリン残基部位と阻害剤とを反応させる工程(第1工程)

2. アルカリ処理を行う工程(第2工程)

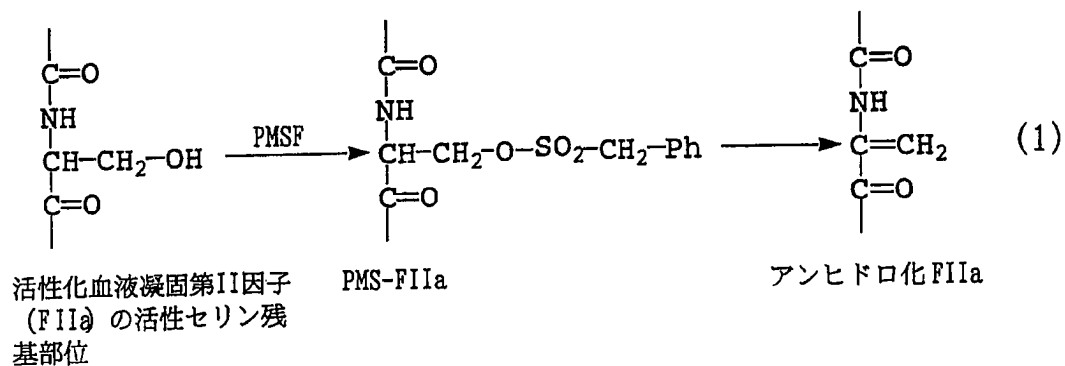
3. 回収を行う工程(第3工程)

を含み、かつ前記各工程を順次行うものであって、

- 15 少なくとも回収操作を行う工程において、多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物と塩もしくは両性電解質を共存させることを特徴とするものである。

該製造方法について、セリンプロテアーゼとして活性化血液凝固第I因子、阻害剤としてフェニルメタンスルホニルフルオリド(PMS

- 20 F)を使用した場合を例にとって説明すれば、下記反応式(1)として表すことができる。



以下、上記アンヒドロ化セリンプロテアーゼの製造方法を上記1～3の工程に従って説明する。

#### (1) 第1工程

- 5 第1工程では、セリンプロテアーゼを合成阻害剤と反応させて、セリンプロテアーゼの活性セリン残基とエステル結合を形成せしめてセリンプロテアーゼ活性を失わせる目的で、セリンプロテアーゼの活性セリン残基部位を合成阻害剤と反応させるものである。

- 10 ここで、上記セリンプロテアーゼとしては、特に制限されるものでなく、既に市販されている各種の活性化血液凝固因子（活性化血液凝固第II因子、活性化血液凝固第VII因子、活性化血液凝固第IX因子、活性化血液凝固第X因子、活性化血液凝固第XI因子、活性化血液凝固第XII因子など）、線溶酵素、カリクレイン、および抗凝固蛋白などをそのまま用いることができるほか、従来公知の各種精製方法を利用して精製
- 15 されてなる製品等を使用することができる。

- また、上記合成阻害剤としては、上記反応式に例示したように、セリンプロテアーゼの活性セリン残基と反応してエステル結合を形成することのできるものであれば、特に制限されるものではなく、例えば、PMSF、2-フェニルエタン-1-スルホニルフルオリド、メタンスルホニルフルオリド、p-トルエンスルホニル（トシル）フルオリドなどの
- 20 各種のスルホニルフルオリド、トシルクロリド、ジイソプロピルフルオ

ロリン酸（以下、DFPともいう）、3，4-ジクロロイソクマリン（以下、3，4-DCIともいう）、L-1-クロロ-3-[4-トシルアシド]-7-アミノ-2-ヘプタノン-塩酸（以下、TLCKともいう）、L-1-クロロ-3-[4-トシルアシド]-4-フェニル-2-ブタノン（以下、TPCKともいう）などが挙げられる。

これら合成阻害剤を添加する際には、該阻害剤をあらかじめメタノール、アセトン、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、プロパン-2-オール、アセトン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどの溶媒に溶解したものを用いてもよい。また、合成阻害剤を添加する際には、過剰な添加によるその後の分離除去操作の煩わしさを低減し、また反応性を高めるため、セリンプロテアーゼの活性を3%以下、より好ましくは1%以下になるまで、確認しながら行うことが望ましい。

さらに、反応溶媒としては、セリンプロテアーゼの生存にも良好なように、浸透圧やイオンの平衡を調節する目的でNaClが調合された塩類溶液、あるいはさらに $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ などのイオンを数種加えた組成のものが調合された塩類溶液であって、さらにpHを安定に維持するように緩衝系としてpH2~10、好ましくはpH4~8を示す緩衝液から任意に選ばれたものを加えたものであれば良い。こうした緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、炭酸塩緩衝液、重炭酸塩緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液、コハク酸-水酸化ナトリウム緩衝液、フタル酸カリウム-水酸化ナトリウム緩衝液、イミダゾール-塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、生理的塩類溶液あるいはグッドの緩衝液などを挙げることができる。

また、反応条件としては、一般に熱的变化がセリンプロテアーゼの安定化にも大きく影響することから、反応温度は-30~50℃、好まし

くは4～40℃の範囲で行うことが望ましい。

上記反応により得られた生成物は、従来公知の方法を用いて精製分離を行う。

精製分離に用いられる方法としては、特に制限されるものでなく、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、限外濾過膜、透析などが挙げられる。代表的なゲル濾過について説明すれば、反応後の溶液を、溶媒で膨潤させたゲル（例えば、セファデックス、バイオゲル、アガロースゲルなど）粒子のカラムに添加し溶媒を流し続けることで、まず高分子溶質のセリンプロテアーゼ生成物、遅れて低分子溶質の合成阻害剤などが溶出し両者が分離されるものである。ここで使用することのできる溶媒としては、セリンプロテアーゼの生存にも良好なように、浸透圧やイオンの平衡を調節する目的でNaClが調合された塩類溶液、あるいはさらに $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ などのイオンを数種加えた組成のものが調合された塩類溶液であって、さらにpHを安定に維持するように緩衝系としてpH2～10、好ましくはpH4～8を示す緩衝液を加えたものであれば良い。こうした緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、炭酸塩緩衝液、重炭酸塩緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸－リン酸ナトリウム緩衝液、コハク酸－水酸化ナトリウム緩衝液、フタル酸カリウム－水酸化ナトリウム緩衝液、イミダゾール－塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、生理的塩類溶液あるいはグッドの緩衝液などを挙げることができる。

## (2) 第2工程および第3工程

第2、第3工程では、エステル結合を解離させると共にセリン残基をアラニン残基に交換して、上記アンヒドロ化セリンプロテアーゼを製造し、さらに高pH領域から中性付近にpHを戻して再生する間に、凝集・会合を起こさずに簡便な操作によって該アンヒドロ化セリンプロテ

アーゼを高収率で得る目的で、第1工程で精製分離されたセリンプロテアーゼ生成物に対し、アルカリ処理を行う工程（第2工程）と、回収操作を行う工程（第3工程）を順次行うものであって、少なくとも回収操作を行う工程において、多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物と塩もしくは両性電解質を共存させることを特徴とするものである。

まず、第1工程で精製分離されたセリンプロテアーゼ生成物を溶解させる溶媒としては、セリンプロテアーゼの生存にも良好なように、浸透圧やイオンの平衡を調節する目的でNaClが調合された塩類溶液、あるいはさらに $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ などのイオンを数種加えた組成のものが調合された塩類溶液であって、さらにpHを安定に維持するように緩衝系としてpH2~10、好ましくはpH4~8を示す緩衝液から任意に選ばれたものを加えたものであれば良い。こうした緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、炭酸塩緩衝液、重炭酸塩緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸ーリン酸ナトリウム緩衝液、コハク酸ー水酸化ナトリウム緩衝液、フタル酸カリウムー水酸化ナトリウム緩衝液、イミダゾールー塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、生理的塩類溶液あるいはグッドの緩衝液などを挙げることができる。

また、上記アンヒドロ化セリンプロテアーゼの製造に使用される多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物は、塩もしくは両性電解質との併用により高pH領域でのアルカリ処理において、蛋白の凝集・会合を起こさずアンヒドロ化を促進し、回収操作において、高pH領域から中性付近にpHをもどす際に、凝集・会合を起こさずアンヒドロ化セリンプロテアーゼを再生する目的で添加するものである。ただし、回収操作にのみ用いても上記アンヒドロ化セリンプロテアーゼの製造の目的を達成し得るものである。

上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物としては、例えば、テトリトール（具体的には、エリトリトール、D-スレイトール、L-スレイトール、D，L-スレイトール）、ペンチトール（具体的には、リビトール、D-アラビニトール、  
5 L-アラビニトール、D，L-アラビニトール、キシリトール）、ヘキシトール（具体的には、アリトール、ダルシトール（ガラクトチトール）、ソルビトール（D-グルシトール）、L-グルシトール、D，L-グルシトール、D-マンニトール、L-マンニトール、D，L-マンニトール、D-アルトリトール、L-アルトリトール、D，L-アルトリトール、  
10 D-イジトール、L-イジトール）、ヘプチトール、マルチトール、ラクチトール、グリセリン、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、1，3-ブチレングリコール、ネオペンチルグリコール、ペンタメチレングリコール、ヘキサメチレングリコール、ペンタエリトリ  
15 トール、ジペンタエリトリトール、トリペンタエリトリトール、トリメチロールエタン、トリメチロールプロパン、無水エンネアヘプチトール、1，4-ブタンジオール、1，2，4-ブタントリオールおよび1，2，6-ヘキサントリオールなどの多価アルコール（糖アルコールを含む）、グリセリンアルデヒドジオキシアセトン、トレオース、エリトルロース、  
20 エリトルロース、アラビノース、リブロース、リボース、キシロース、キシルロース、リキソース、グルコース、フルクトース、マンノース、イドース、ソルボース、グロース、タロース、タガトース、ガラクトース、アロース、プシコース、アルトロースおよびシヨ糖などの糖類などが挙げられる。これらは1種単独若しくは2種以上を混合して用いることができる。なかでも、グリセリン、エチレングリコールおよびシヨ糖より  
25 なる群より選ばれてなる少なくとも1種の化合物が好ましい。



また、上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物は、気温23℃、相対湿度50%の環境下において、液体である場合は体積比で、粉体、粒体または固体である場合は質量比で、全体に対する割合が5%以上、好ましくは15%以上であることが望ましい。ただし、全体に対する割合が5%未満であっても、併用する塩もしくは両性電解質の濃度を相対的に高めることにより、第2～第3工程を行うことは可能であり、所望の効果を有効に発現できる。よって、上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物の全体に対する割合（濃度）は、その種類に応じて、  
5  
10 所望の効果を有効に発現できるように適当な濃度を適宜決定することが望ましく、かかる決定に際しては併用する塩もしくは両性電解質の種類や濃度を考慮する必要がある。

上記アンヒドロ化セリンプロテアーゼの製造に使用される塩もしくは両性電解質は、上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物との併用により高pH領域でのアルカリ処理において、蛋白の凝集・会合を起こさずアンヒドロ化を促進し、回収操作において、高pH領域から中性付近にpHを戻す際に、凝集・会合を起こさず、アンヒドロ化セリンプロテアーゼを再生する目的で添加されるものであって、かかる目的を得るに適した塩濃度（イオン強度）、  
15  
20 誘電率が得られるならば特に制限されるものではなく、有機、無機は限定されるものではない。

よって、上記塩もしくは両性電解質としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム等のハロゲン化アルカリ金属、塩化マグネシウム、塩化カルシウム等のハロゲン化アルカリ土類金属、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、  
25 炭酸アンモニウム、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カ

- ルシウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素アンモニウム、リン酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二アンモニウム、ホウ酸ナトリウム、ホウ酸カリウムなどの無機酸塩、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、クエン酸マグネシウム、クエン酸カルシウム、クエン酸アンモニウム、フタル酸ナトリウム、フタル酸カリウム、フタル酸マグネシウム、フタル酸カルシウム、フタル酸アンモニウム、コハク酸ナトリウム、コハク酸カリウム、コハク酸マグネシウム、コハク酸カルシウム、コハク酸アンモニウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸カルシウム、酢酸マグネシウム、酢酸アンモニウム等の有機酸塩、グリシン、アラニン等の両性電解質となるアミノ酸などの水に可溶な塩もしくは両性電解質が挙げられる。これらは1種単独若しくは2種以上を混合して用いることができる。なかでも、水に易溶で、併存する上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物の濃度に応じて最適なイオン強度（塩濃度）、誘電率に容易に調整でき、さらに精製分離工程（例えば透析など）が容易（ないし簡略化できるもの）である低分子のアルカリ金属塩や無機塩類、両性電解質などが望ましく、具体的には、塩化ナトリウム、塩化カリウムおよびグリシンよりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物が望ましいといえる。
- また、上記塩もしくは両性電解質の濃度は、0.2 M以上、好ましくは0.5 M以上とすることが望ましい。ただし、当該濃度が0.2 M未満であっても、上述した多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物の場合と同様に当該化合物の全体に対する割合を相対的に高めることにより、第2～第3工程を行うことは可能であり、所望の効果を有効に発現できる。

第2工程において、アルカリで処理してアンヒドロ化する（すなわち、

第1工程で精製分離されたセリンプロテアーゼ生成物に対してエステル結合を解離させると共にセリン残基をアラニン残基に交換して、アンヒドロ化セリンプロテアーゼを製造する)には、反応系のpHが11.0以上、好ましくはpHが11.0~13.5の範囲となるように、アルカリを添加して調整し(さらに、必要に応じて、上述した多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物と塩もしくは両性電解質の共存下で)、反応温度-30~50℃、好ましくは4~40℃の範囲を保持する。上記pHが11.0未満の場合には、脱PMSF反応が起こらずアンヒドロ化が進行せず好ましくない。上記

5    カリとしては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの1価の塩基、水酸化カルシウム、水酸化バリウム、酸化カルシウム、酸化マグネシウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムなどの2価の塩基、水酸化鉄などの3価の塩基などを挙げることができる。上記反応温度が-30℃未満の場合には、反応系が凍結する可能性があり好ましくなく、

10   一方、50℃を超える場合には、セリンプロテアーゼが蛋白変性を受け、その後の再生操作によっても元の状態に戻らなくなるなど好ましくない。

次に、第3工程において、上記アルカリ処理により合成されたアンヒドロ化セリンプロテアーゼを含む溶液は、その後(アンヒドロ化反応後)、上述した多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる

20   少なくとも1種の化合物と塩もしくは両性電解質の共存下で再生操作により元の状態(立体構造状態)に戻される。該再生操作としては、特に制限されるものでなく、従来公知の方法を利用することができ、例えば、反応後の系(溶液)のpHを4~10の範囲に溶媒(上記アンヒドロ化反応で用いたと同種の溶媒などが使用できる)にて調整し、-30~5

25   0℃の温度範囲で一定時間保持する方法、透析によりpHを4~10の範囲に調整する方法などをとることができる。

本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤は、S e r - P 抑制物質の他、本発明の効果を損なわない範囲であれば、公知の安定剤や増量剤などの添加剤を含有してもよい。

また、本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤は、粉状、液状、粒剤など  
5 何れの形状であっても構わない。

本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤は、S e r - P 抑制物質を少なくとも1種含むものであるが、たとえば血液凝固系のように、複数のセリンプロテアーゼが一つの現象に関連して作用している場合には、S e r - P 抑制物質を2種以上含むものであってもよい。

10 その一方、トロンピンは、フィブリノーゲン、V I I I 因子、X I I I 因子、プロテインC等を基質として結合し、それぞれを活性化することも知られているが、本発明で使用するアンヒドロトロンピンは、フィブリノーゲン、V I I I 因子、X I I I 因子、プロテインCと、それぞれ  $Kd\ 4.4 \times 10^{-8}$ 、 $Kd\ 1.2 \times 10^{-8}$ 、 $Kd\ 2.8 \times 10^{-7}$ 、  
15  $Kd\ 8.1 \times 10^{-5}$  で結合する。従って、例えば、血液凝固系にアンヒドロトロンピンを添加すると、トロンピンと競争してフィブリノーゲン、V I I I 因子、X I I I 因子、プロテインCに結合することによりこれら基質に対するトロンピンによる活性化を抑制することができる。この場合でも、基質特異性は保持されているといえる。このことは、血  
20 液凝固系がカスケードを構成して連続的に凝固系を促進すると共に、活性化された物質が反応系の上流にある因子を更に活性化することで血液凝固をより迅速に進行させる実情に鑑みると、特定のセリンプロテアーゼ、例えばトロンピンを起源とする抑制剤であっても、各因子に相乗的に作用して血液凝固系を抑制できることを意味する。

25 加えて、血液凝固系の開始には、血液が生体にとって異物の表面と接触して開始する凝固反応系と、血管内皮以外の生体組織に血液が接触す

ることによって開始されるものがある。その概略を説明すると、異物面と接触して最初に起こる凝固反応は、XII因子、XI因子の活性化が続き、更にVII因子、VII因子、IX因子の活性化が続き、更に、X因子の活性化を経てプロトロンビンがトロンビンとなりフィブリノーゲンをフィブリンとする。一方、生体組織に接触する場合には、プロカリクレインや高分子キニノーゲン等の組織成分が活性化されたことで、以降にVII因子、VII因子、IX因子の活性化が続くものである。したがって、例えば、アンヒドロトロンビンを使用すると、異物面の接触による凝固系の抑制にも有効であると共に、組織の接触によって生ずる凝固系の抑制にも有効である。その一方、消化酵素などの活性を抑制することが少ない。しかも、その構造から生体内物質の代謝系にて分解されるため、副作用が少ない利点がある。

また、Ser-P抑制物質が、トリプシノーゲン等の消化酵素のアンヒドロ体である場合には、トリプシノーゲンの活性化を阻止することで腹痛などの自覚症状の軽減と高アミラーゼ血症の改善に有効である。

本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤は、抗血栓剤、線溶酵素抑制剤、抗消化酵素剤、播種性血管内凝固の治療剤として有用である。

特に、従来から使用されている抗血栓療法にはワーファリン等の抗ビタミンK剤も用いられるが同時にプロテインC、プロテインS等の抗凝固として作用する蛋白質の生産をも低下させる。しかしながら、本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤によれば、血液凝固異常の治療及び管理、抗癌治療に対しその起因又は関与するセリンプロテアーゼを特異的に阻害することができる。そして、アンヒドロセリンプロテアーゼを実際に治療薬として用いた場合には、その構造が活性部位セリン残基を除き起源であるセリンプロテアーゼと類似するために生体にとって異物と認識されず、免疫的問題が発生しにくい利点を持つ。

本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤の投与形態は、筋肉注射、静脈注射などの注射剤がある。抑制のターゲットとなるセリンプロテアーゼが血液中に含有される場合、他の多くの抑制剤と同様に静脈注射による投与が望ましい。その一方、癌増殖等の抑制として用いたい場合は癌組織に直接注入する事も可能である。

更に、本発明の抑制剤は、血小板凝集阻害剤として、血小板凝集に起因する、もしくはそれを一因とする種々の疾患の治療もしくは予防に効果的である。特に播種性血管内凝固の治療剤や、心筋梗塞、脳梗塞などの血栓形成による血管の閉塞を阻害もしくは予防するする薬剤として有効である。また、心筋梗塞時の冠状動脈内血栓に対する経皮的冠状動脈形成術後の急性再閉塞阻害剤、ウロキナーゼ等の血栓溶解剤による、梗塞巣への血栓溶解療法時の放出血小板による再閉塞阻害剤として、さらに、体外への血液循環を伴う医学的処置時の、血液凝固阻害剤として有効である。

さらに、本発明血小板凝集阻害剤は、種々の疾患の治療において、前記有効成分の他に、必要に応じて他の医薬として有効な成分、例えば他の種類の血小板凝集阻害成分を含有させることもできる。

本発明の抑制剤を、抗血栓剤、線溶酵素抑制剤、抗消化酵素剤、播種性血管内凝固の治療剤として使用するにあいには、臨床投与量は、注射投与の場合、成人に対し上記有効成分として、抑制の目的となる酵素の存在量及び抑制の度合に依存するものの、1回当たり1～100000mg、より好ましくは10～50000mg、特に好ましくは100～1000mgを注射するのが好ましい。投与回数は1日1回に限られず所定量を複数回に分けて投与してもよく、また、疾患の種類や程度に応じて点滴によって投与することもできる。更に患者の年齢、症状等によって適宜投与量を増減させることもできる。前記の本発明の血小板凝集

阻害剤は、1日1回投与も可能であるが、適当な間隔をあけて所定量を2～3回に分けて投与することもできる。なお、体外循環用に本発明の化合物を用いる場合には、上記の注射剤の形態で用いることができる。投与量も上記の注射剤の投与量に準ずる。

5

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を、実施例をもって具体的に説明する。

#### 実施例1

Cohn Paste III 由来の活性化血液凝固第II因子 ( $\alpha$ -トロンビン)

- 10 5. 21mgを5mM リン酸緩衝液/0.1M NaCl/pH6.5  
10mlに溶解した溶液に、7%フェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF)メタノール溶液30 $\mu$ lを30分おきに総活性が1%未満にまで加える。この溶液を0℃に冷却し、1M NaOHを0.5ml添加し、12分間反応させた。反応後3M NaCl溶液を5ml  
15 加え、さらに19gのグリセリンを加えた。

- この溶液を1M トリス塩酸緩衝液/50% グリセリン/pH7を用い、pHを7.8に調整し、4℃、12時間保持した。その後、50mM トリス塩酸緩衝液/1M NaCl/pH7.5に透析し、さらに50mM トリス塩酸緩衝液/0.1M NaCl/pH7.5に透析した  
20 のち、p-アミジノフェニルメタンスルホニルフルオリド(和光純薬工業株式会社製;以下、単にAPMSFともいう。)により残存活性を完全に不活化した。この溶液を50mM トリス塩酸緩衝液/0.1M NaCl/pH7.5で平衡化したベンザミジンセファロースカラムに添加した。同緩衝液で不純物ピークを完全に洗浄し、50mM トリス塩酸緩衝液/0.1M NaCl/0.2M ベンザミジン/pH7.5により溶出した。この溶液を50mM トリス塩酸緩衝液/1M NaCl
- 25

／pH 7.5により透析しベンザミジンを除去し、アンヒドロ化活性化血液凝固第II因子（アンヒドロトロンビン）2.8mgを得た。

### 実施例2

人血漿由来の活性化血液凝固第VII因子2.5mgを5mM リン酸緩衝液／0.1M NaCl／pH 6.5 10mlに溶解した溶液に、7%フェニルメタンスルフォニルフルオリド（PMSF）メタノール溶液30 $\mu$ lを30分おきに総活性が1%未満にまで加える。この溶液を0℃に冷却し、1M NaOHを0.5ml添加し、1.2分間反応させた。反応後3M NaCl溶液を5ml加え、さらに19gのグリセリンを加えた。

この溶液を1M トリス塩酸緩衝液／50% グリセリン／pH 7を用い、pHを7.8に調整し、4℃、12時間保持した。その後、50mM トリス塩酸緩衝液／1M NaCl／pH 7.5に透析し、さらに50mM トリス塩酸緩衝液／0.1M NaCl／pH 7.5に透析したのち、APMSFにより残存活性を完全に不活化した。この溶液を50mM トリス塩酸緩衝液／0.1M NaCl／pH 7.5で平衡化したベンザミジンセファロースカラムに添加した。同緩衝液で不純物ピークを完全に洗浄し、50mM トリス塩酸緩衝液／0.1M NaCl／0.2M ベンザミジン／pH 7.5により溶出した。この溶液を50mM トリス塩酸緩衝液／1M NaCl／pH 7.5により透析しベンザミジンを除去し、アンヒドロ化活性化血液凝固第VII因子を1.2mg得た。

### 実施例3

ヒト血漿由来の活性化血液凝固第IX因子4.0mgを5mM リン酸緩衝液／0.1M NaCl／pH 6.5 10mlに溶解した液に7%フェニルメチルスルフォニルフルオリド（PMSF）メタノール溶液3



0  $\mu$ l を 30 分おきに総活性が 0.1% 未満になるまで添加した。

この溶液を 0℃ に冷却し 1M NaOH を 0.5ml 添加し、12 分間反応させた。反応後 3M NaCl 溶液を 5ml 添加し、さらに 19g のグリセリンを添加した。

- 5 この溶液を 1M トリス塩酸緩衝液 / pH 7 を用い pH を 8 に調整し、4℃ で 12 時間放置し、その後 50mM トリス塩酸緩衝液 / 1M NaCl / pH 7.5 4℃ で 12 時間透析した。さらにその後 50mM トリス塩酸緩衝液 / 0.1M NaCl / pH 7.5 4℃ で 12 時間透析したのち、APMSF により残存活性を完全に不活化した。この溶液
- 10 をその後 50mM トリス塩酸緩衝液 / 0.1M NaCl / pH 7.5 4℃ で平衡化したベンズアミジンセファロース 6B カラムに添加し同緩衝液で完全に非吸着物を洗浄後 50mM トリス塩酸緩衝液 / 0.1M ベンズアミジン / 0.1M NaCl / pH 7.5 で溶出した。

- 透析によりベンズアミジンを除去し、アンヒドロ化活性化血液凝固第
- 15 IX 因子を約 2.1mg 得た。

#### 実施例 4

- ヒト血漿由来の活性化血液凝固第 X 因子 3.2mg を 5mM リン酸緩衝液 / 0.1M NaCl / pH 6.5 10ml に溶解した液に 7% フェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF) メタノール溶液 3
- 20 0  $\mu$ l を 30 分おきに総活性が 0.1% 未満になるまで添加した。

この溶液を 0℃ に冷却し 1M NaOH を 0.5ml 添加し、12 分間反応させた。反応後 3M NaCl 溶液を 5ml 添加し、さらに 19g のグリセリンを添加した。

- この溶液を 1M トリス塩酸緩衝液 / pH 7 を用い pH を 8 に調整し、
- 25 4℃ で 12 時間放置し、その後 50mM トリス塩酸緩衝液 / 1M NaCl / pH 7.5 4℃ で 12 時間透析した。さらにその後 50mM ト

リス塩酸緩衝液／0.1 M NaCl／pH 7.5 4℃で12時間透析したのち、APMSFにより残存活性を完全に不活化した。この溶液をその後50 mM トリス塩酸緩衝液／0.1 M NaCl／pH 7.5 4℃で平衡化したベンズアミジンセファロース6Bカラムに添加し同緩衝液で完全に非吸着物を洗浄後50 mM トリス塩酸緩衝液／0.1 M ベンズアミジン／0.1 M NaCl／pH 7.5で溶出した。

透析によりベンズアミジンを除去し、アンヒドロ化活性化血液凝固第X因子を約1.4 mg得た。

#### 実施例 5

10 人全血20 mlに上記実施例1で製造されたアンヒドロ化活性化血液凝固第II因子を5 mg／1 ml (5 mM, Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.5) 加え、トロンボエラストグラムによる凝固時間を測定したところ、アンヒドロ化活性化血液凝固第II因子を加えない場合 (1 ml, 5 mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.5 添加)と比較し凝固時間が約3倍に延長さ  
15 れた。

#### 実施例 6

人全血20 mlに上記実施例2で製造されたアンヒドロ化活性化血液凝固第VII因子を0.5 mg／1 ml (5 mM, Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.5) 加え、トロンボエラストグラムによる凝固時間を測定したところ、アンヒドロ化活性化血液凝固第VII因子を加えない場合 (1 ml, 5 mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.5 添加)と比較し凝固時間が約2.1倍に延長された。

#### 実施例 7

人全血20 mlに上記実施例3で製造されたアンヒドロ化活性化血液凝固第IX因子を0.5 mg／1 ml (5 mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH 7.5) 加え、トロンボエラストグラムによる凝固時間を測定したところ、  
25

アンヒドロ化活性化血液凝固第 IX 因子を加えない場合 (1 ml, 5 mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.5 添加) と比較し凝固時間が約 3 倍に延長された。

#### 実施例 8

- 5 人全血 20 ml に上記実施例 4 で製造されたアンヒドロ化活性化血液凝固第 X 因子を 0.5 mg / 1 ml (50 mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.5) 加え、トロンボエラストグラムによる凝固時間を測定したところ、アンヒドロ化活性化血液凝固第 X 因子を加えない場合 (1 ml, 50 mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.5 添加) と比較し凝固時間が約 1.8 倍に
- 10 延長された。

#### 産業上の利用可能性

- 本発明のセリンプロテアーゼ抑制剤であれば、目的とするセリンプロテアーゼの酵素活性のみを選択的に阻害することが可能であり、新機構
- 15 の血栓形成予防薬として有用であるだけでなく、発酵工業や、有用蛋白精製などのそれぞれの分野におけるセリンプロテアーゼ活性の制御において、有効に使用することができる。

## 請求の範囲

1. セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質を含有するセリンプロテアーゼ抑制剤。  
5
2. セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質が、セリンプロテアーゼ活性を示さないセリンプロテアーゼと類似した構造を持つ物質である請求項 1 に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤。  
10
3. セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質が、遺伝子操作によってセリンプロテアーゼの少なくとも一つのアミノ酸を置換、付加、欠如させることによって得られた物質である請求項 1 または 2 に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤。  
15
4. セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質が、アンヒドロ化セリンプロテアーゼである請求項 1 または 2 に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤。  
20
5. 該アンヒドロ化セリンプロテアーゼが、アンヒドロ化された活性化血液凝固第 II 因子、アンヒドロ化された活性化血液凝固第 VII 因子、アンヒドロ化された活性化血液凝固第 IX 因子およびアンヒドロ化された活性化血液凝固第 X 因子から選ばれた 1 種以上である請求項 4 に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤。  
25
6. 該アンヒドロ化セリンプロテアーゼのアンヒドロ化部位が、活性セリン残基のみである請求項 4 または 5 に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤。

7. 該アンヒドロ化セリンプロテアーゼが、
- (1) セリンプロテアーゼの活性セリン残基部位と阻害剤とを反応させる工程、
- (2) アルカリ処理を行う工程、
- 5 (3) 回収操作を行う工程、
- を含み、かつ前記工程を順次行い、少なくとも回収操作を行う工程において、多価アルコールおよび糖類よりなる群より選ばれた1種以上の化合物と、塩若しくは両性電解質を共存させる方法で得られたものである請求項4～6の何れか1項に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤。
- 10 8. 該アルカリ処理を行う工程がpH 11.0～13.5の範囲で行われる請求項7に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤。
9. セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質を2種以上含有する請求項1～4の何れか1項に記載のセリンプロ
- 15 テアーゼ抑制剤。
10. 請求項1～9のいずれか1項に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤を含有する、抗血栓剤。
11. 請求項1～9のいずれか1項に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤を含有する、線溶酵素抑制剤。
- 20 12. 請求項1～9のいずれか1項に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤を含有する、抗消化酵素剤。
13. 請求項1～9のいずれか1項に記載のセリンプロテアーゼ抑制剤を含有する、播種性血管内凝固の治療剤。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04595

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/36, A61P7/02, 7/04, 1/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/36, A61P7/02, 7/04, 1/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Suidan, Hana S., et al., 'The serine protease granzyme A does not induce platelet aggregation but inhibits responses triggered by thrombin' Biochem. J., 1996, Vol.315, No.3, p.939-945	1,2,9,10,13 3-8,12
X Y	Olson, Steven T., et al., 'Role of the catalytic serine in the interactions of serine proteinases with protein inhibitors of the serpin family. Contribution of a covalent interaction to the binding energy of serpin-proteinase complexes, J. Biol. Chem. 1995, Vol.270, No.50, p.30007-17	1,2,4-6,9, 10,13 3,7,8,11,12
X Y	Harmon J.T. and Jamieson G.A., 'Activation of platelets by alpha-thrombin is a receptor-mediated event. D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone-thrombin, but not N alpha-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone-thrombin, binds to the high affinity thrombin receptor' J. Biol. Chem., 1986, Vol.261, No.34, p.15928-33	1,2,4-6,9, 10,13 3,7,8,11,12
X Y	Ashton R.W. and Scheraga H.A., 'Preparation and characterization of anhydrothrombin' Biochemistry, 1995,	1,2,4-6 3,7-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
22 September, 2000 (22.09.00)Date of mailing of the international search report  
03 October, 2000 (03.10.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04595

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Vol.34, No.19, p.6454-63	
X	Tomono, T., 'Preparation of anhydrothrombin and its	1,2,4-6
Y	interaction with plasma antithrombin III' Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi (Acta Haematologica Japonica), 1986, Vol.49, No.4, p.969-79	3,7-13
Y	EP, 882789, A2 (Fujimori Kogyo Co., Ltd.), 09 December, 1998 (09.12.98), Full text & JP, 11-049800, A & US, 5939304, A	1,2,4-13
Y	Pei G. et al., 'Expression, isolation, and characterization of an active site (serine 528----alanine) mutant of recombinant bovine prothrombin' J. Biol. Chem., 1991, Vol.266, No.15, p.9598-9604	1-3,9-13
Y	Nikkei Bio Tech ed., "Nikkei Bio Saishin Yougo Jiten, the 4 <sup>th</sup> printing", Nikkei BP K.K., 1995, page 379, "Serine Protease" (See the description stating that serine protease contains a digestive enzyme, and enzymes having blood coagulation and thrombus lytic action.)	10-13
Y	Goodman & Gilman's 'The Pharmacological Basis of Therapeutics' Ninth Ed., McGraw-Hill, p.1341-1359	10,11,13

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/36, A61P7/02, 7/04, 1/00, 43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/36, A61P7/02, 7/04, 1/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Suidan, Hana S., et al., 'The serine protease granzyme A does not induce platelet aggregation but inhibits reponses triggered by thrombin' Biochem. J., 1996, Vol.315, No.3, p.939-945	1, 2, 9, 10, 13 3-8, 12
X Y	Olson, Steven T., et al., 'Role of the catalytic serine in the interactions of serine proteinases with protein inhibitors of the serpin family. Contribution of a covalent interaction to the binding energy of serpin-proteinase complexes, J. Biol. Chem. 1995, Vol.270, No.50, p.30007-17	1, 2, 4-6, 9, 10, 13 3, 7, 8, 11, 12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.09.00

国際調査報告の発送日

03.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊



4C

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3452



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Harmon J. T. and Jamieson G. A., 'Activation of platelets by alpha-thrombin is a receptor-mediated event. D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone-thrombin, but not N alpha-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone-thrombin, binds to the high affinity thrombin receptor' J. Biol. Chem., 1986, Vol. 261, No. 34, p.15928-33	1, 2, 4-6, 9,
Y		10, 13
X	Ashton R. W. and Scheraga H. A., 'Preparation and characterization of anhydrothrombin' Biochemistry, 1995, Vol. 34, No. 19, p.6454-63	3, 7, 8, 11, 12
Y		
X	Tomono, T., 'Preparation of anhydrothrombin and its interaction with plasma antithrombin III' Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi (Acta Haematologica Japonica), 1986, Vol. 49, No. 4, p.969-79	1, 2, 4-6
Y		3, 7-13
Y	EP, 882789, A2 (Fujimori Kogyo Co., Ltd.), 9.12月.1998 (09.12.98), 全文参照 & JP, 11-049800, A & US, 5939304, A	1, 2, 4-13
Y	Pei G. et al., 'Expression, isolation, and characterization of an active site (serine 528----alanine) mutant of recombinant bovine prothrombin' J. Biol. Chem., 1991, Vol. 266, No. 15, p. 9598-9604	1-3, 9-13
Y	日経バイオテック編, 「日経バイオ最新用語辞典 第四版」, 日経BP社, 1995, 第379頁「セリン・プロテアーゼ」の項 (セリンプロテアーゼには消化酵素や, 血液凝固, 血栓溶解作用を持つ酵素がある旨の記載参照)	10-13
Y	Goodman & Gilman's 'The Pharmacological Basis of Therapeutics' Ninth Ed., McGraw-Hill, p.1341-1359	10, 11, 13